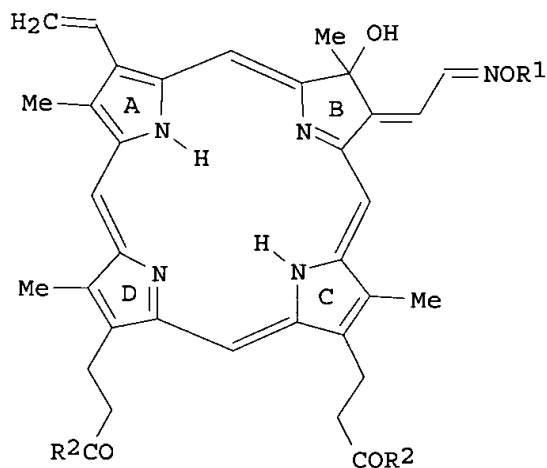


L14 ANSWER 19 OF 26 CAPLUS COPYRIGHT 2003 ACS  
 ACCESSION NUMBER: 1997:443147 CAPLUS  
 DOCUMENT NUMBER: 127:50475  
 TITLE: Preparation of porphyrins as sensitizers in cancer photophysicochemical therapy  
 INVENTOR(S): Sakata, Isao; Nakajima, Susumu; Koshimizu, Koichi; Takada, Hiroyuki; Inui, Yuji  
 PATENT ASSIGNEE(S): Toyo Hakka Kogyo K. K., Japan  
 SOURCE: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 9 pp.  
 CODEN: JKXXAF  
 DOCUMENT TYPE: Patent  
 LANGUAGE: Japanese  
 FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1  
 PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 09124652	A2	19970513	JP 1995-315710	19951030
PRIORITY APPLN. INFO.:			JP 1995-315710	19951030
OTHER SOURCE(S):		MARPAT 127:50475		

GI

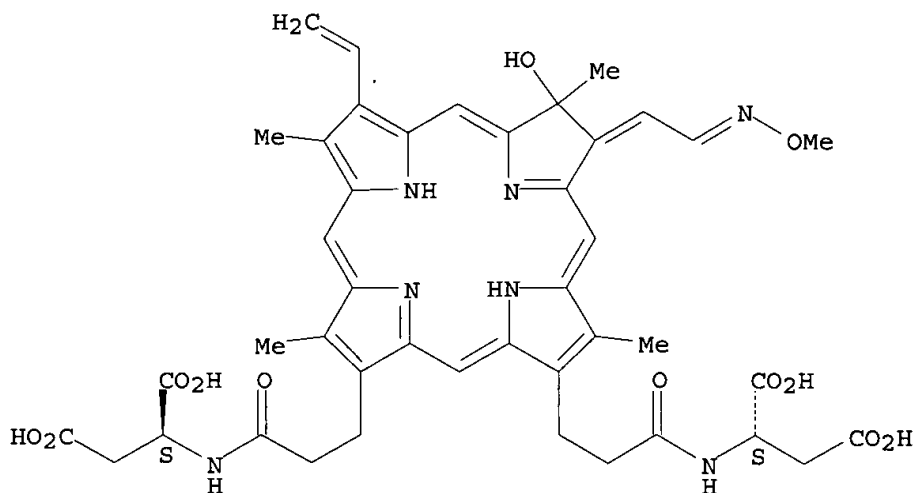


I

AB Title compds. I [R1 = Me, Et, iso-Bu, benzyl, CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>; R2 = aspartic acid residue], including isomers contg. interchanged functionalized substituents in rings A and B, are prepd. Thus, protoporphyrin di-Me ester in CHCl<sub>3</sub> was irradiated according to R. K. Dinello's procedure (1978) to give 1-hydroxy-2-(formylmethylidene)protoporphyrin di-Me ester, which was hydrolyzed in pyridine-methanol to give 42.7% dark green crystals of 1-hydroxy-2-(formylmethylidene)protoporphyrin. The dicyclohexylamine salt of this in CHCl<sub>3</sub> was treated with di-Me aspartate hydrochloride in the presence of water-sol. carbodiimide for 5 h to give 17.3% photoporphyrinyl-6,7-bis(aspargic acid tetra-Me ester). This in pyridine was treated with O-methylhydroxylamine hydrochloride followed by hydrolysis to give 13.9% the title compd. I [R1 = Me, R2 = (S)-NHCH(COOH)CH<sub>2</sub>COOH] (II). II at 0.1 .mu.M sensitized the photooxidn. of dansylmethionine (10 .mu.M in CHCl<sub>3</sub>) in 4 min vs. <10 min for photofrin II.

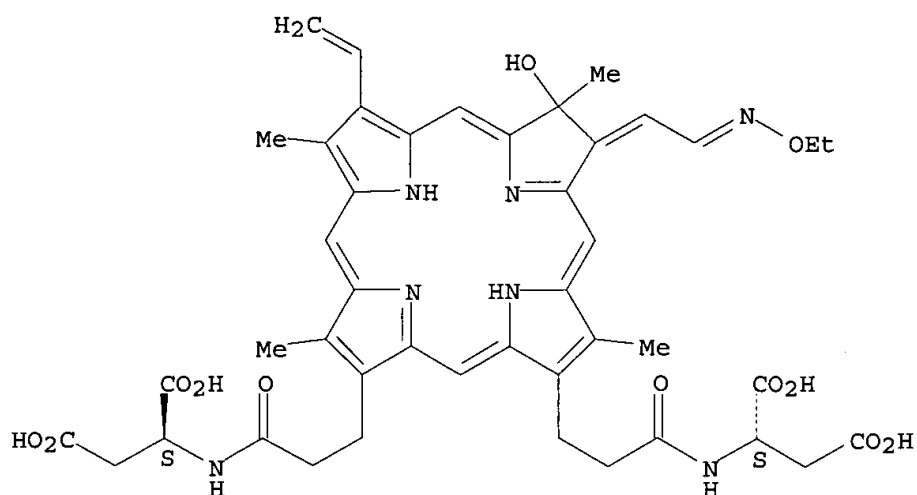
IT **189619-78-1DP**, isomeric mixt. **189619-79-2DP**, isomeric mixt. **189619-80-5DP**, isomeric mixt. **189619-81-6DP**, isomeric mixt. **189619-82-7DP**, isomeric mixt.  
 RL: BAC (Biological activity or effector, except adverse); BSU (Biological study, unclassified); SPN (Synthetic preparation); THU (Therapeutic use); BIOL (Biological study); PREP (Preparation); USES (Uses)  
 (prepn. of porphyrins as sensitizers in cancer photophysicochem. therapy)  
 RN 189619-78-1 CAPLUS  
 CN L-Aspartic acid, N,N'-[[12-ethenyl-7,8-dihydro-8-hydroxy-7-[(methoxyimino)ethylidene]-3,8,13,17-tetramethyl-21H,23H-porphine-2,18-diyl]bis(1-oxo-3,1-propanediyl)]bis- (9CI) (CA INDEX NAME)

Absolute stereochemistry.  
 Double bond geometry unknown.



RN 189619-79-2 CAPLUS  
 CN L-Aspartic acid, N,N'-[[12-ethenyl-7-[(ethoxyimino)ethylidene]-7,8-dihydro-8-hydroxy-3,8,13,17-tetramethyl-21H,23H-porphine-2,18-diyl]bis(1-oxo-3,1-propanediyl)]bis- (9CI) (CA INDEX NAME)

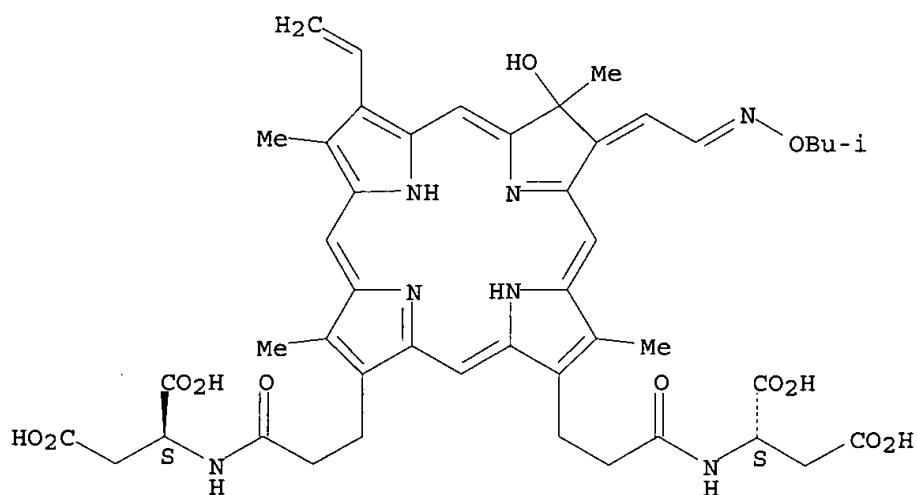
Absolute stereochemistry.  
 Double bond geometry unknown.



RN 189619-80-5 CAPLUS

CN L-Aspartic acid, N,N'-[[12-ethenyl-7,8-dihydro-8-hydroxy-3,8,13,17-tetramethyl-7-[[2-methylpropoxy]imino]ethylidene]-21H,23H-porphine-2,18-diyl]bis(1-oxo-3,1-propanediyl)]bis- (9CI) (CA INDEX NAME)

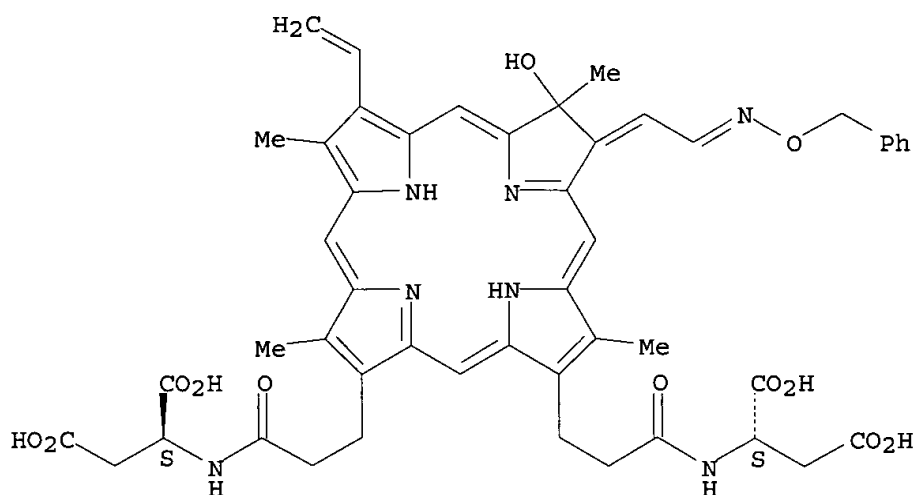
Absolute stereochemistry.  
Double bond geometry unknown.



RN 189619-81-6 CAPLUS

CN L-Aspartic acid, N,N'-[[12-ethenyl-7,8-dihydro-8-hydroxy-3,8,13,17-tetramethyl-7-[[phenylmethoxy]imino]ethylidene]-21H,23H-porphine-2,18-diyl]bis(1-oxo-3,1-propanediyl)]bis- (9CI) (CA INDEX NAME)

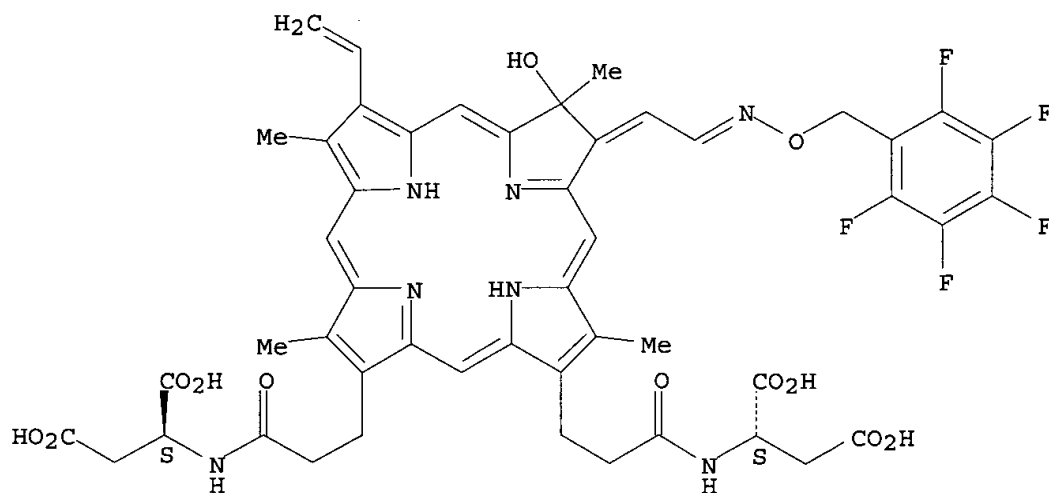
Absolute stereochemistry.  
Double bond geometry unknown.



RN 189619-82-7 CAPLUS

CN L-Aspartic acid, N,N'-[[[12-ethenyl-7,8-dihydro-8-hydroxy-3,8,13,17-tetramethyl-7-[[[(pentafluorophenyl)methoxy]imino]ethylidene]-21H,23H-porphine-2,18-diyl]bis(1-oxo-3,1-propanediyl)]bis- (9CI) (CA INDEX NAME)

Absolute stereochemistry.  
Double bond geometry unknown.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-124652

(43)公開日 平成9年(1997)5月13日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 487/22			C 0 7 D 487/22	
A 6 1 K 31/40	ADU		A 6 1 K 31/40	ADU
49/00			49/00	A
G 0 1 N 33/50			G 0 1 N 33/50	T
				Z
審査請求 未請求 請求項の数 3 書面 (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平7-315710

(22)出願日 平成7年(1995)10月30日

(71)出願人 591273432

東洋薄荷工業株式会社

岡山県浅口郡里庄町大字浜中75番地の1

(72)発明者 阪田 功

岡山県笠岡市小平井1766番地の4

(72)発明者 中島 進

北海道旭川市緑が丘5条4丁目4番地の34

(72)発明者 小清水 弘一

奈良県奈良市法蓮山添西町856番地の10

(72)発明者 高田 弘之

岡山県浅口郡里庄町里見2098番地

(72)発明者 乾 裕史

広島県福山市春日町浦上779番地の7

(74)代理人 弁護士 高橋 三郎

(54)【発明の名称】 ポルフィリン誘導体とその用途

(57)【要約】

【目的】 本発明は、単一成分性、安定性、水溶性かつ特定の臓器特に癌への親和性に優れ、正常組織からの排出速度が速く光毒性を低減させることができ、しかもチタンサファイアレーザー(670nm以上600nm以下の波長)および半導体レーザー(670nm)の使用が可能であるポルフィリン誘導体を合成・探索し、光物理化学的診断治療(PDT)に適した光増感剤を提供することを目的とする。

【構成】 本発明は、血液由来のプロトポルフィリンより合成誘導体化したアルデヒド基担持クロリン類に縮合させて得られたポルフィリン誘導体で構成される。

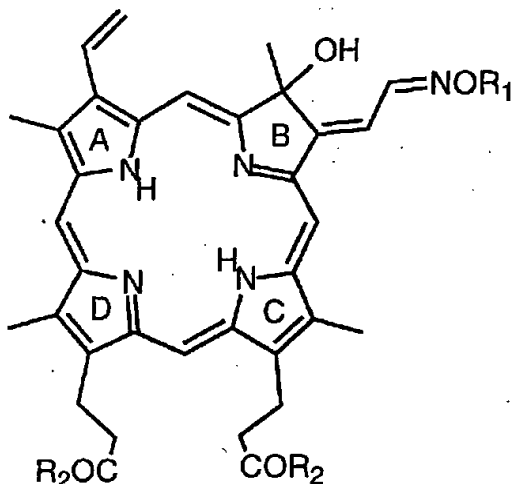
*Photo dynamic  
& therapy*

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 一般式 (I) 化1

(式中、 $R_1$  は $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2C_6H_5$ 、 $CH_2C_6F_5$ 、 $R_2$  はアスパラギン酸から水素を除いた残基) で示されるポルフィリン化合物。(但し、式中、4つのテトラピロール環のうちA及びB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった位置異性体も含む。)

## 【化1】



【請求項2】 請求項1記載のポルフィリン化合物からなる光物理化学的診断用および/または治療増感剤。

【請求項3】 癌の診断および/または治療に使用される請求項2記載の光物理化学増感剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ポルフィリン誘導体とその用途、特に新規なポルフィリン誘導体を有効成分とする光物理化学的診断用および治療用の増感剤および/または光物理化学による癌の診断および治療に用いる薬剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】癌の新しい治療法として光物理化学的診断治療(PDT)が行われている。これはある種のポルフィリン化合物を静脈注射などの方法により投与し、癌組織に保持させた後、レーザー光を照射して癌組織のみを選択的に破壊するというものである。PDTは、ポルフィリンの癌組織に保持される時間が正常組織に比べて長いという性質と光増感作用を持つという2つの性質を利用している。過去15年間に世界中で5000人以上の人々がPDTによる悪性腫瘍の治療を受けており、癌治療法の1つとして定着しつつある。PDTにより良好な治療成績が報告されている癌種は、網膜癌、皮膚癌、食道癌、表在性膀胱癌、初期の肺癌など多岐に渡っている。

【0003】現在PDTに使用されている薬剤は主とし

てヘマトポルフィリン誘導体(HPD)およびphotofrin II $\blacktriangle$ R $\blacktriangledown$ (HPDのエーテル体および/またはエステル体の二量体)である。HPDはヘマトポルフィリンを酢酸中硫酸処理し、さらに0.1N水酸化ナトリウムで処理して得られる混合物である。また、photofrin II $\blacktriangle$ R $\blacktriangledown$ は1995年より日本で臨床応用されているが、HPDの疎水性の高い成分を主として含んでおり、HPDとともに複雑な混合物であり活性成分が不明である。また成分比が一定でないために治療効果が極めて不安定である。

【0004】一方、PDTのための新しいポルフィリン誘導体が特開平1-246286号、昭63-145283号、昭62-205082号、昭62-167783号、特開昭62-249986号、昭62-246580号、昭62-246579号および昭62-205081号に、そしてJ. F. Evensenらにより[Br. J. Cancer, 55, 483(1987)]に開示されている。また、クロリン誘導体が特開平1-250381号、昭63-290881号、昭62-5986号、昭62-5985号、昭62-5924号、昭62-5912号、昭58-981号および昭57-185220号に、ポルフィリンダイマー誘導体が米国特許4649151号(1987)、特開昭62-63586号および昭60-500132号に、ポルフィリン金属錯体が特開平1-221382号、昭63-104987号および昭57-31688号に開示されている。ごく最近になって、670nm付近に吸収を持つメタ-テトラヒドロキシフェニルクロリン(m-THPC)やベンゾポルフィリン誘導体(BPD)などのポルフィリン誘導体も開発されてきた。我々も種々検討し、クロリン誘導体を特開昭61-7279号および昭60-92287号に、ポルフィリン金属錯体を特開平2-138280号、昭62-174079号、特公平4-24661号、平6-15545号および平7-25763号に、バクテリオクロリン誘導体を特開昭63-196586号に開示してきた。しかしながら、PDT用の増感剤として用いるには上記化合物では合成、安定性、水溶性の面において実用化が困難であった。そこで更に検討を行い、アルコキシポルフィリンアミノ酸誘導体およびクロリン誘導体を特開平5-97857号に開示し、PDT用の増感剤としての有効性を示したが、さらに高い治療効果の得られる誘導体が期待されている。

【0005】またPDTに使われるレーザー光の組織透過性の問題もある。HPDやphotofrin II $\blacktriangle$ R $\blacktriangledown$ は最大吸収波長が630nmであり、モル吸光係数も3000と低い。630nmの光では組織透過性が悪く、PDTの治療効果が5~10mmの表層癌に限定されてしまっている。

【0006】一方レーザー装置の方にも問題がある。現

在最もよく使用されている色素レーザーは安定性が悪く、運用上取扱いが難しい。チタンサファイアレーザーを用いれば運用がかなり簡単になる。しかしこのレーザーを用いると670nm以上600nm以下の吸収波長に限られ、630nm付近の吸収波長を持つHPDやPtofrin I I ▲ R ▼には適用できない。最近、半導体レーザー(670nm)も開発され670nmに吸収を持つ化合物が有利とされてきた。

【0007】更に薬剤の副作用として一時的な光過敏症を引き起こすことが知られている。このため薬剤投与後、皮膚などの正常組織が光増感作用で破壊されないように患者を長期間暗所に閉じ込めておかなければならない。HPDおよびPtofrin I I ▲ R ▼は正常組織からの排出速度が遅いので長いときには6週間以上も光過敏症が残ることもある。現在使用されている薬剤はこうした多くの問題点を抱えておりHPDおよびPhotofrin I I ▲ R ▼に代わる新しい薬剤の開発が強く望まれている。そこで上記薬剤が持つ欠点を克服するものとして単一化合物でありかつより長波長領域(650~800nm)に吸収を持つ化合物が第2世代の薬物として提案されている。現在フタロシアニンなどのアザボルフィリン類、クロリン・バクテリオクロリンなどのボルフィリン類、テキサフィリンなどの環拡張型ボルフィリン類などさまざまな化合物が研究されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、単一成分であり安定かつ癌組織に対する良好な集積性を維持したまま、正常組織からは排出速度が速く光毒性を低減させ、しかもできればチタンサファイアレーザー(670nm以上600nm以下の波長)ならびに半導体レーザー(670nm)の使用が可能であるボルフィリン誘導体を探索し、PDTに適した光増感剤を提供することを目的として、種々の研究を重ねた。

【0009】

【問題を解決するための手段】その結果、以前出願の誘導体(特開平5-97857号)の中で血液由来のプロトボルフィリンより合成誘導体化したクロリン類の側鎖に、ある種のイミノ基およびアスパラギン酸残基を結合させると、単一成分で癌組織に対して優れた集積性と正常組織より速やかな排出性を、更に670nm以上の最長波長吸収端を持ち、かつ良好なPDT効果を有することを見出した。

【0010】また本発明者らは以前出願の誘導体(特開平5-97857号)と同様に、これらクロリン誘導体とアルブミンの混液の紫外線吸収(UV)スペクトルを分析したところ、スペクトルの動向が正の方向すなわち特定臓器、特に癌への親和性につながっていることが分かった。

【0011】一方、本発明者らは以前出願の誘導体(特開平4-276488号)と同様に薄層クロマトグラフ

ィー(TLC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により光に対する反応性の強弱を簡便に評価できるダンシルメチオニン基質の系を用いる光増感酸化反応によりこれらクロリン誘導体を評価したところ、強い作用を持つことがわかった

【0012】本発明は上記の知見に基づいて完成されたものであって、その要旨は

一般式 (I) 化1

(式中、 $R_1$ は $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、 $CH_2CH(C_2H_5)_2$ 、 $CH_2C_6H_5$ 、 $CH_2C_6F_5$ 、 $R_2$ はアスパラギン酸から水素を除いた残基)で示されるボルフィリン化合物(但し、式中、4つのテトラピロール環のうちA及びB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった位置異性体も含む)を表す。

【0013】本発明のボルフィリン化合物は、自体常套によって製造することができる。一般式(I)に対応するボルフィリン化合物にあつては、まずアルデヒド基を有する化合物に誘導体化し(工程a)、得られたクロリン誘導体にアスパラギン酸の残基を結合せしめる(工程b)、そして種々のヒドロキシルアミン誘導体を縮合させる(工程c)。また必ずしも工程(b)、(c)は順次反応させる必要はなく(c)、(b)のように工程順が代わっても良い。

【0014】構成工程(a)はJ. E. Falk著[Porphyrins and Metalloporphyrins](Elsevier発行、1975年)およびD. Dolphin著[The Porphyrins](Academic Press発行、1978年)等に記載された常套の方法によってこれを行うことができる。

【0015】例えば(I)に対応する $R_1$ 、 $R_2$ を有するボルフィリン化合物であるものは、特開昭61-7279号、特公昭63-13997号、特公平6-15545、特公平7-25763号、特開平2-138280号、特開平4-59779号、特開平5-97857号および特願平3-323597号に記載された方法に従ってこれを調製すれば良い。すなわちクロリン化工程(a)についてはプロトボルフィリン ジメチルエステル(以下PP-Meと言う)を光化学反応処理して得られた1-ヒドロキシ-2-ホルミルエチリデン-プロトボルフィリンジメチルエステル(以下P-Meと言う)を調製する(ただし、4つのテトラピロール環のうちAおよびB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった3-ヒドロキシ-4-ホルミルエチリデン-プロトボルフィリン ジメチルエステル体も含む)。

【0016】次にアミノ酸の残基の結合工程(b)に付す。すなわち、 $R_2$ が水酸基であるボルフィリン化合物(I)にアスパラギン酸を反応させて、 $R_2$ がアスパラギン酸担持ボルフィリン化合物(I)を製造する。このものは泉屋ら著[ペプチド合成の基礎と実験](丸善発

行、1985年)等に記載された常套の方法によってこれを行うことができ、特開昭64-61481号、特公平7-25763号、特開平2-138280号および特開平4-59779号に記載された方法に従ってこれを調製すればよい。

【0017】この場合、要はボルフィリン化合物の側鎖にアスパラギン酸の残基を導入すればよいから、(I)の $R_2$ 側鎖のカルボキシル基とアスパラギン酸のアミノ基との間で反応を進行させることが好ましく、このため前者のカルボキシル基および/または後者のアミノ基を常套の反応性基に変換したり、両者に存在する反応に関与することが好ましくない官能基を適宜に保護することが考慮されてよい。なお、いずれの場合も適宜脱水剤や脱酸剤のような反応促進剤や縮合剤の使用も考慮されてよい。

【0018】以上のようにして構成したクロリン化合物を縮合工程(c)に付す。P-Meに、ヒドロキシルアミン誘導体を反応させて縮合体ボルフィリン化合物を製造する。このものは一般有機化学実験書中〔ヒドロキシルアミンとアルデヒド化合物との縮合反応〕に記載された常套の方法によってこれを行うことができる。なお人為的に合成する代わりに、植物や動物のような天然資源からこれを採取してもよい。

【0019】以下、代表例を挙げてボルフィリン化合物(I)の調製を更に具体的に説明する。例えばP-Meを加水分解して得られた1-ヒドロキシ-2-ホルミルエチリデン-プロトボルフィリン(以下Pと言う)を調製する(ただし、4つのテトラピロール環のうちAおよびB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった3-ヒドロキシ-4-ホルミルエチリデン-プロトボルフィリンも含む。)。これに、アスパラギン酸メチルエステル等を溶媒中で縮合剤[例えばジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)や水溶性カルボジイミド(WSC)]等を用いて反応せしめて、 $R_2$ の側鎖にアスパラギン酸残基が結合したボルフィリン化合物(I)を得る。次いで、ヒドロキシルアミン誘導体(例えばO-メチルヒドロキシルアミン、O-エチルヒドロキシルアミン、O-ベンジルヒドロキシルアミン等)を溶媒中で縮合剤(例えばピリジン、ピペリジン、酸、アルカリ等)を用いて反応せしめて、 $R_1$ の側鎖にこれらの化合物が縮合したボルフィリン化合物(I)を得る。その具体例としては以下のものを挙げることができる。

【0020】(1) 13、17-ビスプロピオニルアスパラギン酸-3-エテニル-7-ヒドロキシ-8-メトキシイミノエチリデン-2、7、12、18-テトラメチル-ボルフィン(以下NOMe-P-diAspと言う)

(2) 13、17-ビスプロピオニルアスパラギン酸-3-エテニル-7-ヒドロキシ-8-エトキシイミノエチリデン-2、7、12、18-テトラメチル-ボルフ

イン(以下NOEt-P-diAspと言う)

(3) 13、17-ビスプロピオニルアスパラギン酸-3-エテニル-7-ヒドロキシ-8-イソブトキシイミノエチリデン-2、7、12、18-テトラメチル-ボルフィン(以下NOisoBu-P-diAspと言う)

(4) 13、17-ビスプロピオニルアスパラギン酸-3-エテニル-7-ヒドロキシ-8-ベンジルオキシイミノエチリデン-2、7、12、18-テトラメチル-ボルフィン(以下NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-P-diAspと言う)

(5) 13、17-ビスプロピオニルアスパラギン酸-3-エテニル-7-ヒドロキシ-8-ペンタフルオロベンジルオキシイミノエチリデン-2、7、12、18-テトラメチル-ボルフィン(以下NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-P-diAspと言う)

【0021】本発明によるボルフィリン誘導体の医薬品製剤の製造は自体公知法により行われ、本発明による誘導体を適当な緩衝液で溶解するだけでよい。好適な添加物として例えば医薬的に認容できる溶解補助剤(例えば有機溶媒)、pH調製剤(例えば酸、塩基、緩衝液)、安定剤(例えばアスコルビン酸)、賦形剤(例えばグルコース)、等張化剤(例えば塩化ナトリウム)などが配合されても良い。

【0022】本発明による薬剤はPDT用薬剤としての必要十分な特性すなわち長燐光寿命、アルブミンに対する親和性、特定臓器特に癌に対する特異的集積性、ダンシルメチオニン評価による光殺細胞効果、吸収波長、水溶性、純度などを充分満足しているものである。本発明による薬剤の良好な水溶性は、高濃度溶液(50mg/ml)の製造を可能とし、更に本発明による薬剤は試験管内だけでなく生体内でも高い安定性を示す。一般に、PDT用薬剤として適用するためには本発明の薬剤を1mg~5mg/kg体重の量で投与するのが望ましい。

【0023】

【作用】本発明にかかるボルフィリン化合物は、ボルフィリン骨格の側鎖にアミノ酸残基、またはアルデヒド縮合体を有する点に化学構造上の特徴を有し、その結果種々の生理学的もしくは薬理学的特性を発揮する。

【0024】これらボルフィリン誘導体は癌細胞に選択的に集積し、かつ癌細胞からの排泄が遅い。なお、正常な臓器や細胞からは速やかに排泄されるため、それらに損傷を与えることはない。元来、ボルフィリン誘導体の殆んどものは光に対して強い作用を有するが、本発明に従ってボルフィリン誘導体の側鎖に多官能性化合物残基を導入することによって正常組織からの排泄性を高めるとともに、光毒性の発現を極力抑制するようデザインした誘導体が可能となった。また、ボルフィリンをクロリン誘導体化して波長がレッドシフトすることにより治療効果の深達度をはかることができた。これらの特性



(癌親和性、光殺細胞効果、吸収波長、水溶性)に基づき、本発明のポルフィリン誘導体は特定の臓器、特に癌や悪性腫瘍に対するPDT薬剤として有用である。

【0025】以下実施例を挙げて説明する。なお、実施例での収率はすべて出発原料であるP-P-Meから換算して求めた値である。

【0026】

【実施例】

実施例 1

Pの合成

R. K. Dinelloらの方法[The Porphyrins, Academic Press発行、Vol. 1, 303 (1978)]に準じて合成した。P-P-Me 100gをクロロホルム10lに溶解し、照射下一週間反応させた。(ポルフィリンからクロリン誘導体化) 反応後減圧濃縮し、残渣を得た。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: n-ヘキサン-クロロホルム)にて精製して、P-Meを得た。(50.0g) 続いて、これをビリジン・メタノール混液中で加水分解して暗緑色結晶のPを得た。(43.0g、収率42.7%)

【0027】実施例 2

ポルフィリンのアスパラギン酸誘導体化

実施例1で得たP 2gをテトラヒドロフランに溶解しジシクロヘキシルアミン(DCHA)にて常法によりP-DCHA塩(2.0g)とした。本DCHA塩をクロロホルム150mlに溶解し、アスパラギン酸ジメチルエステル(AspMe)塩酸塩2gを加え、攪拌下に水溶性カルボジイミド(WSC) 2gを徐々に加えて1.5時間反応せしめた。反応後(TLCにて反応終末点を確認)、反応液を水洗分液後、クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-エーテル-n-ヘキサンにて再沈殿および再結晶化を繰り返して、暗緑色結晶のフォトプロトポルフィニル-6,7-ビスアスパラギン酸テトラメチルエステル(以下P-AspMeと言う)を得た。(1.2g、収率17.3%)

【0028】実施例 3

NO-Me-P-di Asp (1)の合成

実施例2で得られたP-AspMe 500mgをビリジン20mlに溶解し室温攪拌下にO-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩150mgを添加、30分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い沈殿を濾取乾燥後、ビリジン10mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム10mlを加え加水分解を行った。1N塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、暗緑色結晶のNO-Me-P-di Asp (1)を得た。(390mg、13.9%)

【0029】実施例 4

NOEt-P-di Asp (2)の合成

実施例2で得られたP-AspMe 500mgをビリジン20mlに溶解し、室温攪拌下にO-エチルヒドロキシルアミン塩酸塩150mgを添加、30分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い沈殿を濾取乾燥後、ビリジン10mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム10mlを加え加水分解を行った。1N塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、暗緑色結晶のNOEt-P-di Asp (2)を得た。(420mg、14.8%)

【0030】実施例 5

NOisoBu-P-di Asp (3)の合成

実施例2で得られたP-AspMe 500mgをビリジン20mlに溶解し、室温攪拌下にO-イソブチルヒドロキシルアミン塩酸塩150mgを添加、30分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い沈殿を濾取乾燥後、ビリジン10mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム10mlを加え加水分解を行った。1N塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、暗緑色結晶のNOisoBu-P-di Asp (3)を得た。(450mg、15.3%)

【0031】実施例 6 NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-P-di Asp (4)の合成

実施例2で得られたP-AspMe 500mgをビリジン20mlに溶解し、室温攪拌下にO-ベンジルヒドロキシルアミン塩酸塩150mgを添加、60分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い沈殿を濾取乾燥後、ビリジン10mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム10mlを加え加水分解を行った。1N塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、暗緑色結晶のNOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-P-di Asp (4)を得た。(400mg、13.1%)

【0032】実施例 7

NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-P-di Asp (5)の合成

実施例2で得られたP-AspMe 500mgをビリジン20mlに溶解し、室温攪拌下にO-(ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン塩酸塩150mgを添加、120分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロ

ホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-*n*-ヘキサンにて再沈殿を行い沈殿を濾取乾燥後、ピリジン10mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム10mlを加え加水分解を行った。1N塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をメタノール-酢酸エチル-*n*-ヘキサンにて再沈殿を行い、暗緑色結晶のNOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-P-di Asp (5)を得た。  
(390mg、11.7%)

#### 【0033】実施例 8

摘出器官でのレーザー照射（励起蛍光スペクトル）  
ニトロソアミン発癌の肝癌細胞を移植した14～21日目のゴールデンハムスター（1群五匹）にリン酸緩衝液（1ml）にて希釈した5mgの被験薬剤NOMe-P

-di Asp (1) を静注後、癌を含む各臓器を摘出し、得られた各器官にN<sub>2</sub>-pulsed laser (N<sub>2</sub>、337nm、2ns、400～1000nm) を照射、励起蛍光スペクトルを測定し、470nmのNADHのピーク波長を基準として600～900nmの波長を検討した。(N<sub>2</sub>-PLS測定) 以下同様にして得られた結果（癌/各臓器 比）を表1に示す。表1は薬剤投与3時間後に摘出した各器官の各励起蛍光スペクトルを測定し、470nmのピーク波長を基準1として600～900nmでのピーク波長を算出した値を示す。

【0034】

【表1】

化 合 物 名	癌/臓器			
	癌/肝	癌/肺	癌/腎	癌/血清
(1) NOMe-P-di Asp	0.16	0.91	0.25	1.07
(2) NOEt-P-di Asp	1.16	-	6.70	0.32
(4) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -P-di Asp	1.84	17.0	34.0	5.40
(5) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> -P-di Asp	2.80	14.0	2.80	0.07

#### 【0035】実施例 9

ダンシルメチオニンを用いる光増感酸化反応の評価  
基質（ダンシルメチオニン）10μMをクロロホルム1mlに溶解し、前記実施例で得られた増感剤0.1μMを加え、攪拌下にCold Spot PICL-SX (Nippon P. I. Co., Ltd.) (ハロゲンランプ、150W、80,000Lux) で照射した。光照射1分毎に反応液をTLC板 (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) にスポットし、クロロホルム-メタノール (3:2) で展開後、UVランプ (254nm) でダンシルメチオニンとその酸化生成物（ダンシル

メチオニン スルホキシド)を確認した。TLC板上でダンシルメチオニンが完全に消失した時間を反応終了時間とし、各増感剤の光酸化反応の強弱を比較検討した。その結果を図1および表2に示す。なお、図1中縦軸はRfを横軸は時間(分)を示し、Rf値0.79はダンシルメチオニン、0.43はダンシルメチオニン スルホキシドのスポットである。また、表2の数値は反応完了時間を分で示し、この値(分)が小さければ小さいほど光酸化反応が強いことを意味する。

【0036】

【表2】

化 合 物 名	光反応の強さ
Photofrin®	10<
(1) NOMe-P-di Asp	4
(2) NOEt-P-di Asp	4
(3) NOisoBu-P-di Asp	4
(4) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -P-di Asp	4
(5) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> -P-di Asp	4

## 【0037】実施例 10

## 紫外線吸収スペクトル分析 (アルブミンテスト)

ボルフィリン化合物はアルブミン溶液中で、二単量体あるいは多量体を形成することが知られている。この性質はアルブミン濃度を種々変えて分析を行うことで極大吸収値の移動または吸光係数の変動がみられることで判る。したがって癌細胞との親和性を検討するには簡単なスクリーニングテストである。アルブミン54mgを3mlの生理食塩水に溶解し、1.8%濃度とする。次いでこれを10倍希釈して0.18%とした液を公比3で希釈して各アルブミン濃度(1.8、0.18、0.06、0.02、0.0066、0.0022%)の液を調製した。一方、ボルフィリン誘導体1mgをリン酸緩

衝液(pH8.0)1mlに溶解し、生理食塩水で100mlにした。そしてアルブミン希釈液2mlとボルフィリン溶液2mlを混合し、混液のアルブミン最終濃度を0.9、0.09、0.03、0.01、0.0033、0.0011%とし紫外線吸収スペクトル測定(350~900nm)を行った。またアルブミン希釈液のかわりに生理食塩水およびメタノール溶液中でも同様に測定した。これらの測定結果を表3に示す。その代表例として、NOMe-P-diAsp(1)の紫外線吸収スペクトルを図2および図3に示す。

## 【0038】

## 【表3】

化 合 物 名	波 長 (nm)		
	生理食塩水	メタノール	0.9%アルブミン
(1) NOMe-P-diAsp	665	667	670
(2) NOEt-P-diAsp	665	667	670
(3) NOisoBu-P-diAsp	665	667	670
(4) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -P-diAsp	666	667	670
(5) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> -P-diAsp	666	666	670

## 【0039】実施例 11

## 赤外吸収スペクトル分析

赤外分光光度計によりKBr錠剤法にて本誘導体の赤外吸収スペクトルを測定した。その代表例として、NOEt-P-diAsp(2)の赤外吸収スペクトルを図4に示す。

## 【0040】

【発明の効果】本発明のボルフィリン誘導体は癌細胞への集積性、外部エネルギーに対する反応性ならびに癌細胞の破壊作用を有し、しかも正常細胞に対して毒性を発現することがないから、癌治療薬あるいは癌診断薬として極めて有用である。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】NOisoBu-P-diAsp(3)テトラメチルエステルを増感剤として用いた薄層クロマトグラムを示す図である。

【図2】NOMe-P-diAsp(1)の紫外吸収スペクトルを示す図である。

【図3】NOMe-P-diAsp(1)の紫外吸収ス

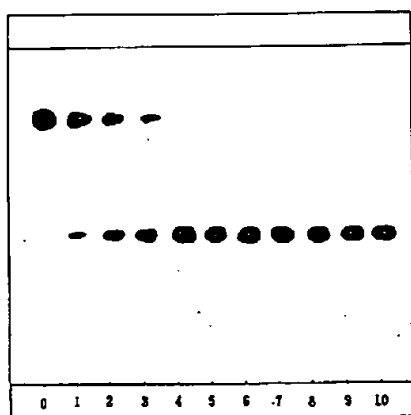
ペクトルを示す図である。

【図4】NOEt-P-diAsp(2)の赤外吸収スペクトルを示す図である。

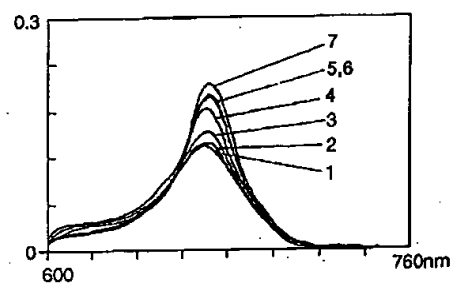
## 【符号の説明】

- 1 ボルフィリン溶液と生理食塩水の混液(アルブミン濃度0%)
- 2 ボルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液(アルブミン濃度0.0011%)
- 3 ボルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液(アルブミン濃度0.0033%)
- 4 ボルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液(アルブミン濃度0.01%)
- 5 ボルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液(アルブミン濃度0.03%)
- 6 ボルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液(アルブミン濃度0.09%)
- 7 ボルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液(アルブミン濃度0.9%)
- 8 ボルフィリン溶液とメタノールの混液

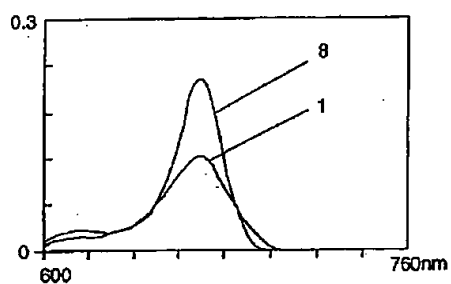
【図1】



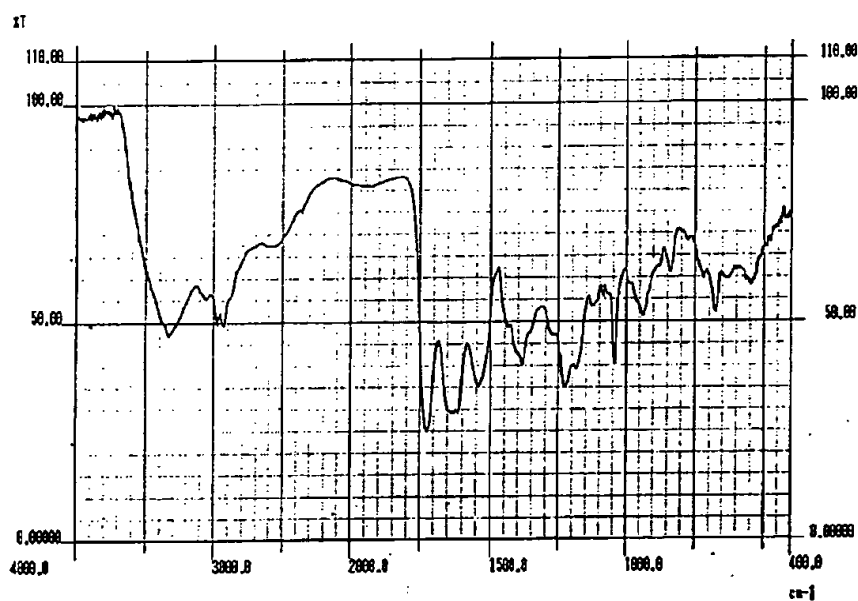
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

// A 6 1 N 5/06

識別記号

庁内整理番号

F I

A 6 1 N 5/06

技術表示箇所

E